

(54) CANDIDA TROPICALIS SDB-101 MUTAGEN AND XYLITOL PREPARATION METHOD
BY THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: *Candida tropicalis* SDB-101 as a new mutant strain is provided for being used in preparation of xylitol product from xylose. CONSTITUTION: *Candida tropicalis* SDB-101 mutant strain is deposited as KFCC-11005. The mutant strain is cultured in such as YM medium consisting of glucose, peptone, yeast extract and malt extract and is fermented in a specific medium comprised of 5-15% xylose, 0.1-2.5% yeast extract from nitrogen resource, 0.1-2.5% potassium phosphate(mono basic) and 0.001-0.5% magnesium sulfate. In order to improve productivity of xylitol, 5-20g/l glucose can be added to the fermentation medium. The xylitol is produced from xylose in the presence of the fermentation medium under pH4.0-6.0 and at 25-35deg.C.

COPYRIGHT 2001 KIPO

공개특허특1999-0065347

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(51) Int. Cl. 6
C12N 1/20(11) 공개번호 특1999-0065347
(43) 공개일자 1999년08월05일

(21) 출원번호 10-1998-0000595

(22) 출원일자 1998년01월12일

(71) 출원인

주식회사 신동양 신명수
서울특별시 영등포구 양평동4가 2번지

(72) 발명자

성태정
서울특별시 동작구 사당4동 269-18
박군식
경기도 안산시 본오2동 769-16 202
안세천
경기도 안산시 사동 1344 신우아파트 606-502호
최길영
경기도 의왕시 오전동 841 백함아파트 103동 401호
도두희
서울특별시 강남구 논현동 동원아파트 3동 201호

(74) 대리인

김연수
이원수

심사청구: 있음

(54) 돌연변이주 캔디다 트로피칼리스 에스디비-101 및 이에 의한자일리톨의 제조 방법

요약

본 발명은 신규한 미생물 및 이를 이용한 자일리톨의 생산 방법에 관한 것으로서 신규한 돌연변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로즈로부터 고 수율의 자일리톨을 생산하는 방법에 관한 것이다.

감미료로 사용되고 있는 자일리톨을 생산하는 방법으로는 화학적인 방법과 미생물을 이용한 방법이 있었으나, 화학적 방법에 의한 경우 경제가 어렵고 수율이 낮으며 위험성 및 폐기물 문제가 있으며, 미생물에 의한 방법인 경우는 비용이 저렴하고 분리 정제 과정이 용이하나, 여전히 그 수율이 낮았는 바, 본 발명은 이러한 종래의 문제점을 해결하고자 발명된 것이다.

본 발명은 자일로즈로부터 자일리톨을 고 수율로 생산하는 돌연변이 균주를 생산하여 이를 이용하여 자일리톨을 고 수율로 생산하고자 하는 발명이다. 본 발명에 있어서, 돌연변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101은 자일로즈 제조회사의 슬러지의 시료를 이용하여 성장 속도가 빠른 균주를 1차 선별하고, 이들 자일로즈, 효모 추출물, 인인산칼륨으로 구성된 배지에서 자일리톨 수율이 높은 균주를 2차 선별 한 후 NTG를 첨가한 YM배지에서 이를 도말한 후 생성된 콜로니를 다시 분리하고 이를 2회이상 반복하여 얻어진 돌연변이 균주를 자일로즈를 포함하는 YM배지에 도말하여 콜로니를 다시 분리한 후 이중 수율이 높고 내열성이 높은 균주를 선별한다. 이 돌연변이 균주를 YM배지에서 배양 후 자일로즈를 갖는 발효 배지에서 배양하여 고 수율의 자일리톨을 얻는 과정으로 구성된 다.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야 종래기술

본 발명은 신규한 미생물 및 이러한 신규의 미생물을 이용한 자일리톨의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자연으로부터 분리한 균주를 돌연변이 시킨 신규한 캔디다 트로피칼리스 SDB-101(한국 미생물 보존협회 기탁번호 KJCC-11005) 및 이를 이용하여 자일로스(xylose)로부터 자일리톨을 얻는 방법에 관한 것이다.

자일리톨은 1891년 화학자 에밀피셔(Emil Fisher)에 의해 처음으로 알려진 후 1960년 이후 감미료로 사용되고 있는 당 알화로서 감미도는 설탕과 같고 용해시 용해 잠입이 크므로 시원한 청량감을 주고 충치 발생과 관련된 스트렙토코커스(*Streptococcus mutans*)의 생육을 저해하여 충치 발생을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있을 뿐만 아니라, 인체 대사 과정에서 인슐린의 비의존성으로 당뇨병 환자의 대체 당원으로 사용되는 특성이 있어서 제과 제품 특히 잼, 식약 등에 활발한 활용한 원료소재이므로 이러한 자일리톨에 대한 관심은 높아졌다.

그러나, 이러한 자일리톨은 제조나 보관등에 존재하기는 하나, 그 양이 미량인 바 이들 자연적으로 분리하는 것은 그다지 경제적이거나 못한 단점이 있다.

자일리톨을 생산하는 방법으로는 화학적 방법 및 미생물을 이용한 방법이 공지되어 있다.

화학적으로 생산하는 방법으로는 자일로스가 다당 함유된 맨 섬유소 가수분해물(hemicellulose hydrolysate)을 환원시키는 방법이 공지되어 있으나, 반응 후 자일리톨과 잔존 가수분해물과의 분리, 정제가 어렵고 그 수율이 낮으며 고압의 반응인 데, 위험성과 폐기물의 문제가 있다.

미생물에 의한 자일리톨의 생산은 효모의 경우 캔디다(*Candida*) 속의 블랭키(*blankii*), 파파시포시스(*parapsilosis*), 트로피칼리스(*tropicalis*), 와 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속의 폼베(*pombe*) 등을 이용한 방법이 있으며, 세균의 경우 엔테로 박터 리퀴파시엔스(*Enterobacter liquifaciens*), 코리네박테리움(*Corynebacterium*)과 마이코박테리움 스메그마티스(*Mycobacterium smegmatis*) 등을 이용한 방법이 있다. 미생물에 의한 방법은 화학적 방법에 비하여 비용이 저렴하고 식물성 원료의 자일로스가 포함된 가수분해물로부터 선별적으로 자일리톨로 전환시킬 수 있어 반응 후의 자일리톨의 분리 및 정제 과정이 용이하나, 그 수율이 낮은 단점 때문에 산업화하기에 어려움이 있었다.

발명이 이루고자하는 기술적 과제

상기한 바와 같은 문제점을 해결하기 위하여 고안된 본 발명은 돌연 변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로스로부터 고 수율 및 고 생산성의 자일리톨을 얻는데 그 목적이 있다.

본 발명의 다른 목적은 신규한 돌연 변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 포도당을 이용하여 균체 증식을 유도하고 이를 이용하여 자일로스로부터 자일리톨을 얻는다. 균주는 자일로스의 제조 회사인 파공 2장, 중국)의 슬러지로부터 자일로스를 분해하여 자일리톨을 생산하는 균을 분리하여 그 중에서 수율과 생산성이 높은 균주를 1차로 선별하고 돌연변이시켜 아성균주보다 수율 50%, 생산성 70%로 향상된 변이주를 제조하고 본 발명을 완성한다.

본 발명의 신규한 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 얻는 방법을 실시예를 통하여 상세히 설명하나, 이에 제한받지는 않는다.

[실시예1]

자일로스 제조 회사의 슬러지의 시료를 적당히 희석한 후 자일로스 10g/l, 펙톤 5g/l, 효모 추출물 3g/l, 아가 15g/l 가 포함된 평판을 이용하여 30℃에서 성장속도가 빠른 균주를 1차 선별하고 이를 선별한 균주들을 자일로스 100g/l, 효모 추출물 5g/l, 일인산칼륨 5g/l로 구성된 배지에서 말표시켜 말표시간 30시간 경과 후 자일리톨 수율이 높은 균주를 2차 선별하였다. 0.05~0.1% NTG(Nitroso Methyl Guanidine)를 첨가한 YM배지(포도당 20g/l, 펙톤 5g/l, 효모 추출물 3g/l, 맥아 추출물 3g/l)에 2차 선별한 아성균주를 도말 한 후 30℃에서 배양하여 생성된 콜로니를 분리하였다. 이 작업은 2회 이상 반복하여 얻어진 돌연변이주를 자외선에 조사하여 자일로스를 포함하는 YM배지에 도말하여 생성된 콜로니를 다시 분리하였다. 분리한 콜로니로부터 수율 및 생산성이 높고 내당성이 30% 이상인 균주를 최종적으로 선별하였다.

이러한 방법으로 선별된 캔디다 트로피칼리스 SDB-101의 공학적 특성은 하기와 같다.

1. 온도에 따른 균의 증식

20℃ : + 30℃ : + 37℃ : + 42℃ : -

2. 균의 증식

40% D-글루코즈 : +, 50% D-글루코즈 : -, 비타민이 제거된 배지 : -

3. 요소 분해 : -

4. 전분 형성 : -

5. Diazonium blue B 형성 반응 : -

6. 질산염의 이용 : -

7. 키틴라테 : -

8. 탄소원의 이용

글루코즈 : + 갈락토즈 : + L-솔비트 : + 슈크로즈 : +

말토즈 : + 락토즈 : - 트레할로즈 : + 셀로비오즈 : +

멜리비오즈 : - 라피노즈 : + 메세지도즈 : + 가용성 전분 : +

D-자일로즈 : + L-아리비노즈 : + D-아라비노즈 : - D-리보즈 : -

D-람노즈 : - 글리세롤 : + 에리쓰롤 : - 리비톨 : +

갈락티톨 : + D-만니톨 : + D-솔비톨 : + D-글루시톨 : -

자일리톨 : - 이노시톨 : - 살리신 : - 이눌린 : -

DL-락트산 : - 숙신산 : + 시트르산 : + 포름산 : -

에탄올 : + 메탄올 : -

이러한 신규한 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 하기와 같은 방법으로 자일리톨을 생산한다.

종 배양은 냉동 보관된 돌연변이 균주를 YM배지 50ml가 들어 있는 250ml플라스크에 접종하여 220rpm 으로 10 시간 성장시킨다. 이러한 종 배양액의 10%를 발효배지(최적 배지, 즉, 탄소원으로 자일로스 100g/l를 사용하였고 질소원으로는 효모 추출물 10g/l, 일인산칼슘 5g/l, 황산 마그네슘 0.2g/l으로 구성된 배지)에 접종한 후, 진탕배양 기로 220rpm에서 자일로스가 완전히 소모 될 때 까지 배양한다. 발효종 배양은 발효 초기에 200g의 자일로스가 함유된 배지 부피가 3l인 5L 발효조(한국발효기(주))를 사용한다.

자일로스와 자일리톨 및 글루코스의 농도 측정은 Carbohydrate Aminex-87C칼럼(Boi-Rad,USA)이 장착된 HPLC (WATERS,USA)의 Refractive Index Detector를 이용하여 측정하였다. 이때, 용매는 물을 사용하였고 온도는 85℃이고 유속은 0.6ml/min이다.

균체농도는 막도계를 이용하여 600nm에서 탁도를 측정하여 미리 측정한 표준곡선을 이용하여 건조 중량으로 환산하였다. 용존 산소는 Ingold(Swiss,polarographic type)의 용존 산소 전극을 사용하여 측정하였다.

하기의 실시예를 통하여 본 발명을 좀더 상세히 설명한다.

[실시예2]

본 발명의 신규한 돌연변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101(KFCC-11005)을 YM 배지 50ml가 들어있는 250ml플라스크에 접종하여 220rpm 30℃ 으로 10시간 배양하였다. 그후 이 종배양액을 발효 배지(최적배지)

50ml가 들어있는 250ml플라스크에 집중한 후 진탕 배양기로 220rpm에서 30℃로 자일로스가 완전히 소모 될 때까지 배양하였다. 시간 경과에 따른 자일리톨의 생산을 살펴 본 결과는 표 1과 같다.

[표 1]

(250ml 플라스크에서 초기 자일로스 농도가 100g/l인 경우 분리 균주의 시간에 따른 자일리톨의 생산)

배양시간 (시간)	균체농도(g/l)	자일로스(g/l)	자일리톨(g/l)
0	0.03	100	
10	3.5	92.0	0
20	5.21	52.7	37
30	5.50	12.6	73
32	5.37	0.0	82

자일로스 초기 농도가 50-150g/l인 경우 자일리톨의 생산 수율이 높았다.

[실시예 3]

배양 방법은 실시예 2와 동일하며 자일로스 100g/l, 질소원 5g/l, 인인산 칼륨 5g/l로 구성된 발효배지에서 발효시킨 30시간 후 질소원이 자일리톨의 생산에 미치는 영향을 살펴본 결과는 표 2와 같다.

[표 2]

(250ml플라스크에서 자일리톨의 생산에 미치는 질소원의 영향)

질소원	균체 농도(g/l)	자일리톨(g/l)
효모 추출물	5.10	72.8
효모질소	6.90	62.4
트립톤	4.53	15.9
대두박	6.51	9.4
옥수수 침지액	7.24	5.4
맥아 추출물	4.85	5.4
펩톤	3.31	6.8

질소원 중 효모 추출물이 가장 좋은 질소원임을 알 수 있다.

[실시예 4]

배양방법, 발효 배지는 실시예 2와 동일하며 이중 효모 추출물의 농도를 변화 시켜 30시간 동안 배양한 결과는 표 3과 같다.

[표 3]

(250ml 플라스크에서 효모 추출물 농도별 자일리톨의 생산량)

효모 추출물(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
1	1.2	0.0
5	5.5	73.0
10	5.2	84.8
20	3.4	72.8

효모 추출물의 농도가 5-25g/l 일 때 자일리톨 생산 수율이 높았다.

[실시예5]

배양 방법 및 배양 배지는 실시예 2와 동일하며 본 배양에서 발효 배지 중 일인산 칼륨의 농도를 변화시키면서 30 시간 동안 배양한 결과를 표 4에 표시하였다.

[표 4]

(250ml 플라스크에서 일인산칼륨 농도별 자일리톨의 생성량)

일인산칼륨(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0	0.03	0.0
2	5.3	56.8
5	5.5	84.9
7	5.2	80.15

일인산칼륨의 농도가 2-25g/l인 경우 자일리톨 생산 수율이 높게 나타났다.

[실시예6]

배양 방법 및 배양 배지는 실시예 2와 동일하며 본 배양에서 발효 배지 중 황산 마그네슘의 농도를 변화시키면서 30 시간 동안 배양한 결과를 표 5에 표시하였다.

[표 5]

(250ml 플라스크에서 황산 마그네슘 농도 별 자일리톨의 생성량)

황산 마그네슘(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0.0	5.4	84
0.1	5.38	85.5
0.2	5.7	87.0
1.04	6.0	83.7

황산마그네슘의 농도가 0.1-5g/l인 경우 자일리톨 생산수율이 높게 나타났다.

[실시예7]

종 배양은 실시예 2와 같고, 본 배양은 최적 발효 배지(자일로스 100g/l, 효모 추출물 10g/l, 일인산칼륨 5g/l, 황산 마그네슘 0.2 g/l, 황산암모늄 5g/l)로 3인 51발효조를 사용하여 배양하였다. 배양온도 30℃에서 여러 pH별 실험을 수행하였다. pH를 변화시켜 자일로스가 완전히 소모 될 때까지 배양한 결과는 표 6과 같다.

[표 6]

(51발효조에서 pH별 자일리톨의 생성량)

pH	균체 농도(g/l)	자일리톨(g/l)	배양시간(시간)
3.5	5.2	62.2	43
4.5	5.35	86.5	29
5.5	6.5	81.6	26
6.5	7.3	50.7	28

pH 4.0-6.0에서 자일리톨 생산 수율이 높았다.

[실시예 8]

배양 방법과 발효 배지는 실시예 7과 같고 본 배양에서 배양 pH는 4.5로 하여 배양 온도별 실험을 수행하였고 배양한 결과는 표 7과 같다.

[표7]

(5) 발효조에서 온도별 자일리톨의 생성량)

온도	균체 농도(g/l)	자일리톨 농도(g/l)	배양시간(시간)
27	7.4	85.1	33
30	5.8	86.2	30
33	5.4	76.7	36
36	4.5	57.9	43
39	1.5	3.50	82

배양온도 23-35℃에서 자일리톨 생산 수율이 가장 높았다.

[실시예 9]

선정된 최적 배지에서 자일로스의 농도를 300g/l로 증가시켜 발효조에서 자일로스의 유가성 배양을 수행하였다. 배양은 발효 초기에 200의 자일로스 가 함유된 배지 부피가 21인 5l발효조(한국 발효기 (주) 판매)를 사용하였다. 발효 과정 중에 175g의 자일로스가 함유된 250ml의 용액을 4번 (19.5시간, 26시간, 32시간, 37.5시간)간헐적으로 추가하여 최종 배양액의 부피는 3l였다. 용존 산소는 교반 속도를 300-600rpm으로 조절하여 초기에는 10%이상 유지시키고 균체 농도가 약 10g/l되는 시점에서 교반 속도를 150-400rpm으로 변화 시켜 용존산소를 제한하였다. 시간에 따른 자일리톨의 생산은 표 8과 같다. 이러한 방법으로 300g/l의 자일로스로부터 4시간만에 252g/l의 자일리톨을 얻었다.

[표8]

(발효 조에서 300g/l의 자일로스로부터 시간 별 자일리톨의 생성량)

배양시간(시간)	균체 농도(g/l)	자일로스(g/l)	자일리톨(g/l)
0	0.1	100	
6	0.56	99.5	
12	14.0	70	
20	21.9	2	58.2
20	17.8	79	52
25	21.8	2.1	119.5
25	18.5	73	106.3
32	22.6	2.8	175.0
32	19.8	67	159.6
36	21.8	5.7	211.6
36	18.6	63.9	195.5
41	20.5	0.0	252.0

본 실시예와 같이 용존 산소를 조절하면 용존 산소를 조절하지 않았을 때의 수율인 50%이하에 비하여 34% 향상된 84%의 높은 수율을 얻을 수 있는 것이며, 자일로스 배지에 자일로스를 간헐적으로 첨가함으로써 수율을 좀 더 높일 수 있다.

[실시예10]

배양 방법 및 배양 배지는 실시예 2와 동일하며 플라스크에 균체를 접종한 후 30℃로 30시간까지 배양하였고 배지의 pH는 발효 초기에 5.0으로 조절한 후 조절하지 않았다. 이때 배지 성분은 포도당 0-30g/L, 자일로스 100 g/L, 효모 추출물 5g/L, 황산암모늄 5g/L, 인산칼륨 5g/L이었다. 발효 배지에 포도당 첨가 농도에 따른 자일리톨의 생산을 살펴본 결과는 표 8과 같다.

[표9]

(250ml플라스크에서 포도당의 농도에 따른 자일리톨의 생성)

포도당(g/l)	균체농도(g/l)	자일리톨(g/l)
0	5.25	75.1
5	5.71	91.3
10	6.09	94.4
15	6.23	89.7
20	6.50	80.3
30	7.42	58.9

배양결과 포도당을 5-20g/l를 첨가하였을 경우 첨가하지 아니한 대조구에 비하여 수율이 높아지는 것을 알 수 있다.

[실시예11]

중 배양은 실시예2와 동일하며 균체 농축을 위한 전단계 배양으로서 포도당 배지(포도당 30g/l, 효모추출물 10g/l, 인산칼륨 5g/l, 황산마그네슘 0.2g/l)가 3L 들어 있는 5L발효조를 사용하여 12시간 동안 배양하였다. 이때, 배양 pH와 온도는 각각 5.0과 30℃였다. 시간에 따른 균체농도, 자일로스농도 및 자일리톨 농도는 표 10과 같다.

[표10]

(포도당으로 증식시킨 캔디다 트로피칼리스 SDB-101의 농축균체를 이용한 자일리톨의 생성량)

시간(시)	균체농도(g/l)	자일로스 농도(g/l)	자일리톨 농도(g/l)
0	20.6	100.0	0.0
3.5	21.3	75.6	13.5
5	21.5	44.3	49.5
6	21.7	22.0	68.0
7	21.1	0.0	88.2

배양결과 캔디다 트로피칼리스 SDB-101에 의한 자일리톨 생산 수율은 88%이었고 평균 용적 생산성은 14.5g-자일리톨/L-h를 얻었다. 이러한 결과는 자일로스 대신 포도당에서 성장시킨 균체를 농축하면 균체 농도와 비례적으로 자일리톨의 생산성은 증가한다는 것을 나타낸다.

발명의 효과

이성과 같이, 감미료로 사용되고 있는 자일리톨은 천연적으로 생산하기 어려운 화합물인 바 이를 생산하는 종래의 기술이 다수 공지되어 있기는 하나, 화학적 방법 및 미생물을 이용한 방법 모두 단점을 갖고 있다. 따라서, 본 발명에 의하면 자일로스를 탄소원으로 이용 가능할 뿐만 아니라, 자일리톨 생산 수율이 높은 돌연 변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 생산하여 고 수율로 자일리톨을 생산하기에 이른 것이다. 뿐만 아니라, 화학적 방법에 비하여 비용이 저렴하고 정제과정이 매우 용이한 효과를 아울러 갖는다.

(57)청구의 범위

청구항1

돌연변이 균주인 캔디다 트로피칼리스 SDB-101(KFCC-11005호).

청구항2

제1항의 캔디다 트로피칼리스 SDB-101을 이용하여 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항3

제2항에 있어서, 캔디다 트로피칼리스 SDB-101의 배양 배지는 포도당, 펙톤, 효모 추출물, 맥아 추출물로 구성

된 YM배지이고, 발효배지는 자일로스로, 질소원으로 효모 추출물, 무기염으로 일인산칼륨과 황산마그네슘이 사용된 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항4

제 3항에 있어서, 발효 배지 조성이 자일로스 5-15%, 효모 추출물 0.1-2.5%, 일인산칼륨 0.1-2.5% 및 황산마그네슘 0.001-0.5%인 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항5

제 3항에 있어서, 자일로스 배지에 포도당을 5-20g/l 첨가하여 자일리톨 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항6

제 3항에 있어서, 자일로스 배지는 배양 pH가 4.0-6.0이고 배양온도가 25-35℃인 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항7

제 3항에 있어서, 자일로스 배지에 자일로스를 간헐적으로 첨가하여 자일리톨의 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.

청구항8

제 3항에 있어서, 발효 초기 균체 중식기에서는 높은 용존 산소농도를 유지하고 자일리톨 생산기에는 용존 산소농도를 제한하여 자일리톨의 생산성을 높이는 것을 특징으로 하는 자일로스로부터 자일리톨을 생산하는 방법.